

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 41 27 737 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 41 27 737.6
㉔ Anmeldetag: 22. 8. 91
㉕ Offenlegungstag: 25. 2. 93

⑤1 Int. Cl.⁵:
A 61 K 31/42
A 61 K 31/275
// (A 61 K 31/42,
31:275)

DE 41 27 737 A 1

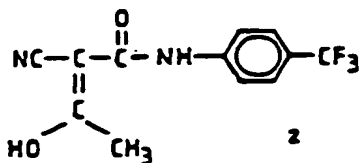
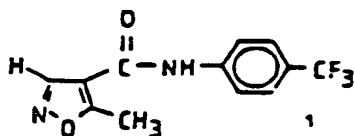
㉚ Anmelder:
Hoechst AG, 6230 Frankfurt, DE

㉚ Erfinder:
Bartlett, Robert R., Dr., 6100 Darmstadt, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉜ Arzneimittel zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen bei Organverpflanzungen

㉞ Es wird die Verwendung der Verbindung 1 und/oder 2 der Formeln



sowie von physiologisch verträglichen Salzen der Verbindung 2 zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen des Organempfängers gegen das verpflanzte Organ beschrieben.

DE 41 27 737 A 1

Aus der Europäischen Patentschrift 13 376 ist 5-Methylisoxazol-4-carbonsäure-(4-trifluormethyl)-anilid (Verbindung 1) als antiphlogistisch bekannt. Dort sind ebenfalls Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung beschrieben.

Ferner ist bekannt, daß die Verbindung 1 und ihr Metabolit N-(4-Trifluormethylphenyl)-2-cyano-3-hydroxycrotonsäureamid (Verbindung 2) immunmodulierende Eigenschaften haben, so daß sie sich als Arzneimittel gegen chronische Graft-versus-Host-Krankheiten sowie gegen Autoimmunerkrankungen, insbesondere systematischen Lupus erythematodes eignen (EP-A-2 17 206).

Die US-Patentschrift 40 61 767 beschreibt die Verwendung von 2-Hydroxyethylidencyanessigsäureanilinderivaten zur Herstellung von Arzneimitteln mit antiphlogistischer und analgetischer Wirkung.

In den USA wurden 1990 15 000 Organverpflanzungen vorgenommen. Die Mehrzahl der Verpflanzungen betrifft die Niere, aber es werden auch zunehmend Herz, Haut, Lunge, Leber und Bauchspeicheldrüse verpflanzt. Bei einer Vielzahl der Patienten kommt es dabei zu einer Abstoßungsreaktion des Körpers gegen das übertragene Organ, das von einem anderen Menschen stammt. Man unterscheidet dabei unter drei Formen der Abstoßungsreaktion: hyperakute, akute und chronische Abstoßung.

Die hyperakute Abstoßung wird im wesentlichen durch im Blut zirkulierende Antikörper verursacht, die gegen das Gewebe des übertragenen Organs (Transplantat) gerichtet sind, und in sehr kurzer Zeit — häufig in Minuten — zu Nekrosen am Transplantat führen.

Bei der akuten Abstoßung des Transplantats ist die Abstoßungsreaktion zeitlich verzögert. Daneben gibt es die chronische Form des Krankheitsverlaufes. Die Transplantate überleben das erste Jahr der Verpflanzung, können jedoch im Laufe der nächsten Jahre abgestoßen werden. Ferner ist bekannt, daß sich die Transplantat-Wirt-Beziehung nicht allein auf die Abstoßung durch den Wirtsorganismus beschränkt; in bestimmten Fällen kann eine vom Transplantat ausgehende, gegen das Wirtsgewebe gerichtete Immunreaktion eintreten (EP-A-2 17 206). Man unterscheidet daher zwischen einer Abstoßungsreaktion zwischen Transplantat und Wirt und zwischen Wirt und Transplantat.

Ferner ist bekannt, daß es auch zu Abstoßungsreaktionen kommt, wenn Organe von verschiedenen Organismenarten, beispielsweise von Maus auf die Ratte, übertragen werden (Roitt et al., Immunology, Gower Medical Publishing Ltd., 1985).

Bisher sind keine Arzneimittel bekannt, die einen wirksamen Schutz gegen die hyperakute Abstoßungsreaktion bieten. In der Klinik werden bisher Spender und Empfänger des Organs auf Unverträglichkeit getestet. Bei 20 bis 40% der Patienten ergibt sich dabei der Fall, daß sie kein Spenderorgan erhalten können. Die akute Abstoßungsreaktion kann behandelt werden, jedoch zeigen die Medikamente bei der Therapie nephrotoxische Nebenwirkungen. Bisher sind auch keine Medikamente bekannt, die die Ursache der chronischen Abstoßungsreaktion behandeln können.

Als wesentlicher pathogener Faktor für den Gewebsuntergang bei dem Transplantat werden allophile und xenophile Antikörper angesehen (Auchincloss H., Transplantation 46, 1, 1988). Diese Antikörper sind im wesentlichen für die Abstoßung bei Organübertragung

gen innerhalb einer Organismusart (allo) oder zwischen zwei verschiedenen Arten (xeno) verantwortlich.

Überraschenderweise zeigen Verbindung 1 und ihr Metabolit, die obengenannte Verbindung 2, eine starke Inhibierung der Bildung allophiler oder xenophiler Antikörper. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die hyperakute, akute und chronische Abstoßungsreaktion des Empfängers gegen das verpflanzte Organ wirksam zu behandeln.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung von 5-Methylisoxazol-4-carbonsäure-(4-trifluormethylphenyl)-anilid und N-(4-Trifluormethylphenyl)-2-cyano-3-hydroxycrotonsäureamid und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen des Organempfängers gegen das verpflanzte Organ.

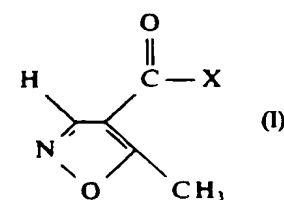
Geeignete physiologisch verträgliche Salze der Verbindung 1 sind beispielsweise Alkali, Erdalkali- oder Ammoniumsalze, einschließlich solcher von physiologisch verträglichen organischen Ammoniumbasen.

Unter dem Begriff Organ, werden alle Organe bei Säugetieren, insbesondere des Menschen verstanden, beispielsweise Niere, Herz, Haut, Leber, Bauchspeicheldrüse, Muskel, Knochen, Darm oder Magen, aber auch Blut oder Haare.

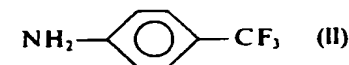
Unter Abstoßungsreaktion sind alle Abwehrmaßnahmen des Empfängerorganismus gemeint, die letztlich zum Zell- oder Gewebsuntergang des übertragenen Organs führen bzw. die Lebensfähigkeit des übertragenen Organs beeinträchtigen.

Die Verbindungen 1 und 2 können nach folgendem Verfahren hergestellt werden:

Eine Verbindung der Formel



in der X für ein Halogenatom, vorzugsweise Chlor oder Brom steht, wird mit dem Amin der Formel II



zur Verbindung 1, umgesetzt und kann anschließend in Gegenwart eines basischen Mittels zur Verbindung 2 umgesetzt werden.

Die obengenannten Umsetzungen erfolgen unter Standardbedingungen auf bekannte Weise (EP-B-13 376, US 40 61 767).

Die Ausgangsstoffe der Umsetzungen sind bekannt oder lassen sich nach literaturbekannten Methoden leicht herstellen.

Gegenstand der Erfindung sind auch Arzneimittel, die eine wirksame Menge der Verbindung 1 oder Verbindung 2 und/oder physiologisch verträgliche Salze der Verbindung 2 enthalten, neben pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoffen, Verdünnungsmitteln und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können oral, topisch, rektal, intravenös oder auch parenteral appliziert

werden. Die Applikation erfolgt vor, während und nach einer Organverpflanzung beim Empfänger und/oder Spender.

Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro)Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel, wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel oder Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als häufig verwendete Hilfsstoffe seien z. B. Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Cellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle, Polyethylenglykole und Lösungsmittel, wie etwas steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, z. B. Glycerin, genannt.

Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte Dosis von der Verbindung 1 oder 2 und/oder physiologisch verträgliche Salze der Verbindung 2 enthält. Bei festen Dosierungseinheiten, wie Tabletten, Kapseln oder Suppositorien, kann diese Dosis bis zu etwa 300 mg, bevorzugt jedoch 10 bis 200 mg betragen.

Für die Behandlung eines Patienten (70 kg), dem ein Organ übertragen wurde sind in frühen Phasen nach der Übertragung eine intravenöse Infusionsbehandlung von maximal 1200 mg pro Tag und in der späteren Rehabilitationsphase eine orale Verabreichung von 3 mal 300 mg pro Tag der Verbindung 1 oder 2 und/oder der entsprechenden Salze der Verbindung 2 indiziert.

Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Dosen angebracht sein. Die Verabreichung der Dosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber mehreren kleineren Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

Schließlich können die Verbindung 1 oder 2 und/oder deren entsprechende Salze bei der Herstellung der vorgenannten galenischen Zubereitungsformen auch zusammen mit anderen geeigneten Wirkstoffen, beispielsweise Antiuricopathika, Thrombocytenaggregationshemmern, Analgetika und steroidalen oder nichtsteroidalen Antiphlogistika, kombiniert werden.

Beispiel 1

Pharmakologische Prüfungen und Ergebnisse

2 bis 3 Monate alte Ratten (LEW) werden mit $2 \cdot 10^7$ menschlichen peripheren Blutlymphocyten intraperitoneal (i. p.) sensibilisiert. Die i. p. Applikation der Verbindung 2 beginnt 4 Tage vor der Sensibilisierung und endet 10 Tage nach der Sensibilisierung der Ratten. Serumproben werden aus der Schwanzvene entnommen, bei -80°C gelagert; durch Hitzeaktivierung wird die Komplementfunktion vermieden.

Die natürlich vorkommenden xenophilen Antikörper (nXA) und die durch Sensibilisierung induzierten xenophilen Antikörper (sXA) werden titriert und lebenden menschlichen peripheren Blutlymphocyten zugesetzt (45 min. bei 20°C). Nach intensivem Waschen werden FITC-markierten Ziegen-Antiratten oder -IgM-Antikörper zugefügt und die Bindung an sXA oder nXA

durch Flow-Cytometrie (FACScan, Becton Dickinson) quantitativ bestimmt.

A) Nicht-sensibilisierte Ratten

Männliche LEW-Ratten enthalten in ihrem Serum nXA die an vitale menschliche periferer Blutlymphocyten binden und zwar meistens mit einem durchschnittlichen IgM-Titer von 1 : 4 und einem durchschnittlichen IgG-Titer der kleiner als 1 : 1 ist. Die Ratten (n=8), die mit der Verbindung 2 behandelt werden, zeigen am 11. Tag eine 30% Reduktion beim IgG-Titer und eine 50% Reduktion beim IgM-Titer.

B) Sensibilisierte Ratten

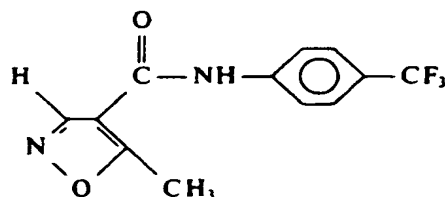
Bei sensibilisierten Ratten ergeben sich stark erhöhte Mengen an sXA. Der IgG-Titer beträgt 1 : 1024 bis 1 : 6384 und der IGM-Titer 1 : 4 bis 1 : 256. Der IgG-Titer bleibt über 50 Tage stabil, während der IgM-Titer nach dem 10. Tag langsam abnimmt.

Die sensibilisierten Ratten (n=5) werden mit 3 und 10 mg/kg der Verbindung 2 behandelt. Am 11. Tag ergeben sich folgende sXA-Titer:

Verbindung (mg/kg)	IgG	IgM
0	1 : 2048	1 : 90
3	1 : 25	1 : 16
10	1 : 1	1 : 1,5

Beispiel 2

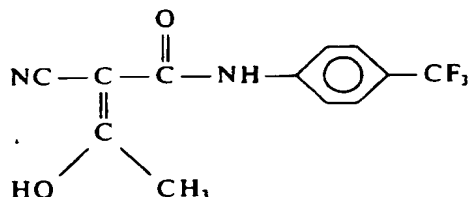
Herstellung von 5-Methylisoxazol-4-carbonsäure-(4-trifluormethyl)-anilid (Verbindung 1)



Eine Lösung von 0,05 Mol 5-Methylisoxazol-4-carbonsäurechlorid (7,3 g) in 20 ml Acetonitril werden tropfenweise bei Raumtemperatur in eine Lösung von 0,1 Mol 4-Trifluormethylanilin (16,1 g) in 150 ml Acetonitril gegeben. Nach 20 Minuten Rühren wird das ausgefallene 4-Trifluormethylanilin-hydrochlorid abgesaugt, zweimal mit je 20 ml Acetonitril gewaschen und die vereinigten Filtrate unter vermindertem Druck eingeeengt. Man erhält so 12,8 g weißes, kristallines 5-Methylisoxazol-4-carbonsäure-(4-trifluormethyl)-anilid (Verbindung 1).

Beispiel 3

Herstellung von
N-(4-Trifluormethylphenyl)-2-cyano-3-hydroxycroton-
säureamid (Verbindung 2)



Es werden 0,1 Mol 5-Methylisoxazol-4-carbonsäure-
(4-trifluormethyl)-anilid in 100 ml Methanol gelöst und
bei +10°C mit einer Lösung von 0,11 Mol (4,4 g) Na-
tronlauge in 100 ml Wasser versetzt. Es wird 30 Minuten
gerührt und nach Verdünnen mit Wasser mit konzen-
trierter Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Kristall-
brei wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und an der
Luft getrocknet.

Die Ausbeute beträgt 24,4 g N-(4-Trifluormethylphenyl)-
2-cyano-3-hydroxycrotonsäureamid (Verbindung 2).
Schmelzpunkt aus Methanol 205 bis 206°C.

Beispiel 4

Akute Toxizität nach intraperitonealer Verabreichung

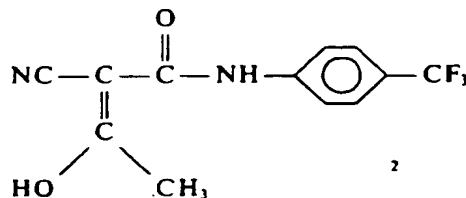
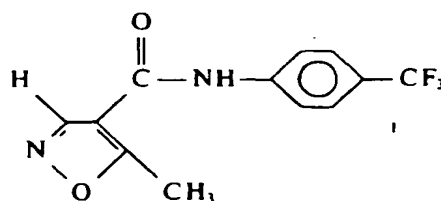
Die akute Toxizität nach intraperitonealer Verabrei-
chung der Testsubstanzen wurde mit NMRI-Mäusen
(20 bis 25 g) und SD-Ratten (120 bis 195 g) durchgeführt.
Die Testsubstanz wurde in einer 1%igen Natrium-Car-
boxymethylcellulose-Lösung suspendiert. Die verschie-
denen Dosierungen der Testsubstanz wurden den Mäu-
sen in einem Volumen von 10 ml/kg Körpergewicht und
den Ratten in einem Volumen von 5 ml/kg Körperge-
wicht verabreicht. Pro Dosierung wurden 10 Tiere ver-
wendet. Nach 3 Wochen wurde die akute Toxizität nach
der Methode von Lichtfield und Wilcoxon bestimmt.
Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle

	Verbindung 1 akute Toxizität intraperitoneal LD ₅₀ (mg/kg)	Verbindung 2 akute Toxizität intraperitoneal LD ₅₀ (mg/kg)
NMRI-Maus	185 (163—210)	(100—200)
SD-Ratte	170 (153—189)	

Patentansprüche

1. Verwendung der Verbindung 1 und/oder 2 der
Formeln



wobei die Verbindung 2 als solche oder in Form
eines physiologisch verträglichen Salzes vorliegt,
zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung
von Abstoßungsreaktionen des Organempfängers
gegen das verpflanzte Organ.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß das Arzneimittel vor, während und/
oder nach der Verpflanzung beim Empfänger oder
Spender des Organs verabreicht wird.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß das Arzneimittel zur Behand-
lung von hyperakuten oder akuten Abstoßungsre-
aktionen eingesetzt wird.

4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß das Arzneimittel zur Behand-
lung von chronischen Abstoßungsreaktionen ein-
gesetzt wird.

5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß das Arzneimittel bei der
Übertragung von Organen von einer Organis-
musart auf eine andere Art verwendet wird.

6. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß die Menge der allophilen oder
xenophilen Antikörper vermindert wird.

7. Arzneimittel zur Behandlung von Abstoßungsre-
aktionen des Organempfängers gegen das ver-
pflanzte Organ, gekennzeichnet durch einen wirk-
samen Gehalt von der Verbindung 1 und/oder 2,
wobei die Verbindung 2 als solche oder in der Form
eines physiologisch verträglichen Salzes vorliegen
kann.

8. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels
gemäß Anspruch 7 zur Behandlung von Abstoß-
ungsreaktionen des Organempfängers gegen das
verpflanzte Organ, dadurch gekennzeichnet, daß
man die Verbindung 1 oder 2 und/oder ein physio-
logisch verträgliches Salz der Verbindung 2 mit ei-
nem physiologisch annehmbaren Träger und weite-
ren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in
eine geeignete Darreichungsform bringt.